



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月27日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-294463

出 願 人

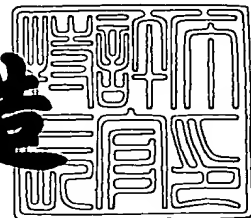
Applicant(s):

株式会社荏原製作所

2001年 4月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3035909

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-35475

【提出日】 平成12年 9月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区羽田旭町 1 1 番 1 号 株式会社荏原製作所  
内

【氏名】 長澤 浩

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区羽田旭町 1 1 番 1 号 株式会社荏原製作所  
内

【氏名】 廣瀬 政義

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区羽田旭町 1 1 番 1 号 株式会社荏原製作所  
内

【氏名】 福永 明

【特許出願人】

【識別番号】 000000239

【氏名又は名称】 株式会社荏原製作所

【代理人】

【識別番号】 100105647

【弁理士】

【氏名又は名称】 小栗 昌平

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100105474

【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100108589

【弁理士】

【氏名又は名称】 市川 利光

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100115107

【弁理士】

【氏名又は名称】 高松 猛

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100093573

【弁理士】

【氏名又は名称】 添田 全一

【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 092740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0002923

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 反応プローブチップ及びその作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 反応性プローブを担持させたタイル状の担体を、基材の上の区分に整列固定させたことを特徴とする反応プローブチップ。

【請求項 2】 前記反応性プローブを担持させるタイル状の担体が反応性表面を持つ材料であり、これを固定する基材が薄板状の無機基板又は有機基板であることを特徴とする請求項 1 記載の反応プローブチップ。

【請求項 3】 タイル状の担体上に酵素、抗原、DNA 断片、抗体、エピトープ又はタンパク質を固定し、該担持した担体ごと、それぞれ基材の上の区分に整列・固定させることを特徴とする反応プローブチップの作製方法。

【請求項 4】 タイル状の担体上に任意の塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドを合成した後、担体ごと、それぞれ基材の上の区分に整列・固定させることを特徴とする請求項 3 記載の反応プローブチップの作製方法。

【請求項 5】 タイル状の担体は大きさが一辺 50 ミクロン～5 ミリメートルの正方形、六角形、円形などの形をした板状であり、基板へ機械的に張り付け、固定させることを特徴とする請求項 3 又は請求項 4 記載の反応プローブチップの作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA 診断及び治療等に使用される反応プローブチップ及びその作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子の変異、特に一塩基配列の変異による多型の検出は、突然変異等に起因する疾患、例えば、ガンの診断等に有効だけでなく、薬剤応答性や副作用の指針に必要であり、病因遺伝子の解析や予測医療にも貢献する。この検出にいわゆる DNA チップの使用が有効であることが知られている。DNA チップは、通常

約 1 c m 角のシリコンもしくはガラス基板上にフォトリソグラフィー技術を用いて 1 万以上の DNA 断片 (DNA プローブ) を作り込んだものである。この DNA チップ上に、たとえば蛍光標識した、調べたい DNA 試料を流すと、上記 DNA チップ上のプローブと相補的な配列を有する DNA 断片はプローブと結合し、その部分だけが蛍光により識別でき、DNA 試料中の DNA 断片の配列を解明することができる。この方法により、既に、ガン遺伝子の突然変異の検出が可能であることが示されている。

### 【 0 0 0 3 】

#### 【発明が解決しようとする課題】

上記 DNA チップの作製は、半導体産業で使用されているフォトリソグラフィーの技術が必要である。しかしながらこの場合、予め DNA チップ上に固定する DNA プローブの種類が決まっており、また必要な設備のある所でこのような DNA チップを作製し供給することは容易であるが、一塩基ずつ合成していくためにはそれぞれ異なったフォトマスクを用意し、反応工程も長く、柔軟に異なった目的に応じた DNA プローブを固定した DNA チップを作ることは困難であるばかりか、大変なコストもかかるという問題点もあった。また、必要とされる DNA プローブの数が少ない場合、チップ上への DNA プローブの集積度は、それ程高い必要はない。むしろ、より簡便に所望の DNA プローブを固定したチップが欲しい場合がある。また、各個人の DNA の多型を検出し医療に役立てるためには、低コストでかつ安定性の高い DNA チップを提供する必要がある。

### 【 0 0 0 4 】

そこで本発明の目的は、フォトリソグラフィー設備を必要としない、より容易かつ安価に作製できる DNA チップ等の、反応性プローブをその表面に集積した反応プローブチップを提供することにある。

### 【 0 0 0 5 】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、前記の課題により、反応工程が長く複雑であり、柔軟に異なった目的に対応することが困難で、大変なコストもかかるフォトリソグラフィー技術を使用することなく、それでいて前記フォトリソグラフィー設備を使用した場

合と同等の高い集積度を表面に有する反応プローブチップの材質や形態について種々研究した。

そして、担体上に任意の塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドを合成した後、タイル状担体ごと、それぞれ基板に固定させると上記の問題点を解消できることに着目して、本発明に到達した。

#### 【0006】

すなわち、本発明は、下記的手段により前記の課題を解決した。

(1) 反応性プローブを担持させたタイル状の担体を、基材の上の区分に整列固定させたことを特徴とする反応プローブチップ。

(2) 前記反応性プローブを担持させるタイル状の担体が反応性表面を持つ材料であり、これを固定する基材が薄板状の無機基板又は有機基板であることを特徴とする前記(1)記載の反応プローブチップ。

#### 【0007】

(3) タイル状の担体上に酵素、抗原、DNA断片、抗体、エピトープ又はタンパク質を固定し、該担持した担体ごと、それぞれ基材の上の区分に整列・固定させることを特徴とする反応プローブチップの作製方法。

(4) タイル状の担体上に任意の塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドを合成した後、担体ごと、それぞれ基材の上の区分に整列・固定させることを特徴とする前記(3)記載の反応プローブチップの作製方法。

(5) タイル状の担体は大きさが一辺50ミクロン～5ミリメートルの正方形、六角形、円形などの形をした板状であり、基板へ機械的に張り付け、固定させることを特徴とする前記(3)又は(4)記載の反応プローブチップの作製方法。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、反応性プローブを担持させたタイル状担体を多数、基板の表面の区分にそれぞれ固定させることを特徴とする反応プローブチップに関するものであって、同時に多数の反応を行わせることができるものであるから、前記反応性プローブは多種類からなるものである。前記タイル状担体を配置するための区分は

、多数の反応性プローブを担持させたタイル状担体に対して、機械的に、特に自動的に行うことができるようにする関係で、整然と配列させることが好ましい。区分は柵目状になっていることが好ましい。

また、担体上に任意の塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドを合成した後、タイル状担体ごと、それぞれ基板に固定させることを特徴とする反応プローブチップの作製方法に関する。この場合、オリゴヌクレオチドを担持した小さなタイル状担体をその表面に接触することがないように、かつ素早く順次基板上の区分に搬送することができる手段を用いる必要がある。

#### 【0009】

本発明のチップは、ガラス板、多孔質ガラスなどの反応性表面を持つ小さなタイル状の担体の表面に、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質などの反応性プローブを担持させ、この反応性プローブを担体ごと基板表面上の区分に固定化することにより、安定でかつ柔軟な生産に対応できる。

基材は、検出システムに対して変化しない安定な素材であれば良いが、担体を固定するのに適した表面特性を持つことが必要であり、石英ガラス、ホウケイ酸ガラスなどのガラス基板、シリコンウエハなどの無機基板が好ましい。材質がガラスの場合、多孔質ガラスであると表面の反応性が高いので好ましいが、加工の面で難しくなる。材質としては、セラミックスも使用できるが、小さなタイル状の担体を製造することが容易であるものであることがよい。

また、担体との結合方法を工夫することにより、ポリエステルフィルム、ポリエチレンフィルムなどの有機基板を用いることもできる。これらの場合、一般に表面の反応性が低いので、基板表面には、担体結合材との親和性等を調整する目的で、適当な表面処理を施すこともできる。

#### 【0010】

また担体は、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質などの反応性プローブを担持するものであるから、これらの物質に影響を与えることのない材料から構成されることが必要であり、かつ、その形状は板状、ないしはフィルム状でよいが、機械的強度のあるものが好ましい点から板状であるのがよく、ガラス板、多孔質ガラス板のような無機材料が好ましい。

しかし、一定の強度が保たれるのであれば、板状に成形されたイオン交換樹脂なども使用できる。担体表面は、反応性プローブの密度が適切に保たれるように、例えばガラス板の場合は、機械的若しくは科学的に表面を粗面にすることが好ましい。また、反応性プローブとの親和性等を調整する目的で、適当な表面処理を施すことが好ましい。

#### 【0011】

担体への反応性プローブの担持方法は、特に規定はないが、たとえば担体表面にアミノ基を固定した後、グルタルアルデヒドを用いて酵素を固定する方法などが用いられる。また、特定の大きさの反応性プローブを固定・担持するのではなく、オリゴヌクレオチド合成のように担体上で反応物質を合成し、そのまま用いてもよい。

#### 【0012】

担体の大きさ、形態は任意に選べるが、基板上に多数の異なる種類の反応性プローブを担持した担体を固定することを考えると、タイル状の担体の大きさが一辺50ミクロン～5ミリメートルの正方形、六角形、円形などの形をした板状が好ましく、特に100ミクロン～1ミリメートルの方形が好ましい。また、その厚さとしては、その大きさとも関係するが、100～200ミクロンの範囲のものが好ましい。タイル状担体の基板への固定は、反応に影響しない何らかの接着剤を用い、基板上へ機械的に張り付け配列・固定する。

タイル状担体の基板への固定のために用いる接着剤としては、例えばアクリル樹脂などが挙げられる。

また、基板上へのタイル状担体の固定のためには、半導体装置の製造に際して用いられる微小部材の加工、搬送等において用いられている装置を用いることができる。

#### 【0013】

基材の形状には特に制限はなく、例えば、薄板、フィルムまたはシートのような平板状のものであることができ、それ以外に立方体、棒状、紐状、球状のものであっても良い。板状の場合、基板の厚みや大きさにも特に制限はなく、基板の厚みは、基板に必要とされる形状安定性を考慮して適宜決定され、さらに基板の



大きさは、基板表面上に設けられる微小区分の数等を考慮して適宜決定される。

なお、本発明において、基板表面上の微小区分とは、仮想の区分であって、各区分が物質的に分割されて存在する訳ではなく、仮想的に設けた区画である。また、基板に固定する際、大型の基板に同時に多数の区画に組み合わせて固定し分割することにより、生産効率を上げることも期待できる。

#### 【0014】

本発明における「反応性プローブ」における「反応性」とは、化学反応によりイオン結合や共有結合による化学構造等が変化する場合のみではなく、ファンデルワールス力、水素結合、配位結合、化学吸着、物理吸着等のその他の様式により、他の物質と結合した状況を得る性質を意味する。そのような反応性プローブとして例えば、酵素、抗原、DNA断片、抗体、エピトープ、タンパク質等を挙げることができるが、当然のことながらこれらに限定されるものではない。

#### 【0015】

例えば、反応性プローブとして、担体上に合成したDNA断片であるオリゴヌクレオチドの場合、検出対象DNAサンプルとハイブリタイズにより、特定配列のDNAを検出することが出来る。

本発明の反応プローブチップにおいて、微小区分、即ち反応性プローブの区分の集積度には特に制限はない。反応プローブチップの用途に応じて必要とされ、かつ便利な集積度も用途によって異なるので、用途に応じて、適宜集積度は変化させることができる。例示的には、反応プローブチップ表面  $1 \text{ cm}^2$  当たりの微小区分は、100個以上とすることができ、基板の材質や反応性プローブを調整することにより、表面  $1 \text{ cm}^2$  当たり10000個程度の微小区分を設けることができる。

#### 【0016】

本発明の反応プローブチップは、反応性プローブが担体に固定化されているため、基板上で滲みや、遊離することが少なく、かつ、担体が板状であり、かつ各担体上の反応性プローブ密度は、別途厳密に管理できるので、チップ全体での反応性の均一性がはかれる。

担体に固定する反応性プローブは、反応プローブチップの用途に応じて、同種

または異種の物質であることができる。また、作業効率の観点からは、複数の反応性プローブを一度に担持させることが好ましく、より好ましくは、全ての反応性プローブを一度に担持させる。

【0017】

反応性プローブ担持担体は、それぞれ別途合成し保存することができ、必要に応じて、必要な組み合わせで、基板上に固定化することができる。

特に、オリゴヌクレオチドを合成した担体の場合、通常の合成プロセスが利用できるので、極めて実用性が高い。

【0018】

本発明の反応チップの製造方法を図面により説明する。

図1は、その製造工程を図解したものであり、工程(a)では、反応チップの基板となるスライドガラス1上の反応性プローブを設置する領域に接着剤2を塗布する。

次いで、工程(b)では、予め製造しておいた同じ反応性プローブ担持タイル3を多数載置している基板を置いてある領域Aに、下端に吸引チャック4を有する配列機4を持っていき、吸引チャック5で反応性プローブ担持タイル3を吸引し、工程(c)で、その配列機4をスライドガラス1上に移動させ、所定位置において吸引を解除して放出させ、運んできた反応性プローブ担持タイル3をその所定位置に固定する。

続いて、工程(d)で、別の反応性プローブ担持タイル3を多数載置している基板を置いてある領域Bから配列機4によって前記タイル3を搬送し、続いた所定位置に固定し、この作業を順次繰り返すことにより、異なった種類の反応性プローブ担持タイル3を配列していく。

これにより、工程(e)で、所定位置に異なった種類の反応性プローブ担持タイル3が配列された反応チップ6を得ることができる。

【0019】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

## 【 0 0 2 0 】

## 実施例 1

表面アミノ化した 1 mm 角、厚さ 10 ミクロンの「カバーガラス」にある種の特異反応を持つ酵素をグルタルアルデヒドを用い固定した。同じように各種の酵素を固定した「カバーガラス」を用意し、これを半導体ワイヤーボンダーを改造して作成した配列装置を用い、縦 75 mm、横 25 mm、厚さ 1.5 mm のアクリル系接着剤が塗布されたスライドガラス上に配列していった。1 mm 画のそれぞれの区画に担持させた。100 種類の抗原酵素反応を行える反応検出チップが作製された。

## 【 0 0 2 1 】

## 実施例 2

表面アミノ化した 0.5 mm 角、厚さ 10 ミクロンの多孔質ガラスに定法により各種のオリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチド固定多孔質ガラスを縦 75 mm、横 25 mm、厚さ 1.5 mm のアクリル系接着剤が塗布されたスライドガラス上に配列していった。1000 種類の相補型 DNA 検出チップが作製された。

## 実施例 3

表面アミノ化した 0.5 mm 角、厚さ 10 ミクロンの多孔質ガラスに定法により各種のオリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチド固定多孔質ガラスをエポキシ接着剤コーティングポリエステルフィルム（約 3 cm × 20 cm、厚さ 0.3 mm）の表面に、0.5 mm ピッチで配列し、本発明の反応チップを得た。

## 【 0 0 2 2 】

## 【発明の効果】

本発明によれば、フォトリソグラフィー設備等の特別な設備を要することなく、DNA 断片等の反応性プローブをその表面に集積した反応プローブチップを、容易かつ安価に提供することができる。また、基板の材質の選定や反応性プローブの担持方法を工夫することで、既存の DNA チップより、高い集積度を有するチップを提供することも可能である。

各種反応性プローブを担持した担体を準備しておけば、必要なときに、必要な組み合わせのDNAプローブを固定したチップから簡便に供給できるばかりか、異なった種類の反応性プローブを固定化した反応性検出チップが構成でき、各個人のDNAの多型を検出し医療に役立てる、低コストでかつ安定性の高いDNAチップを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の反応プローブチップの製造工程を図解した説明図を示す。

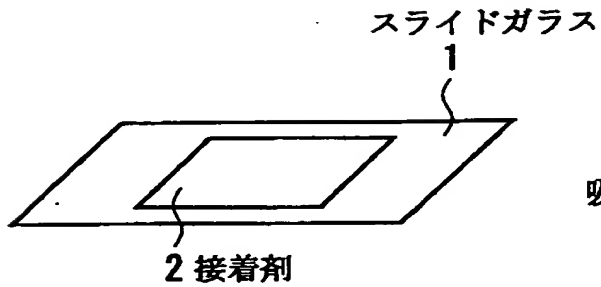
【符号の説明】

- 1 スライドガラス
  - 2 接着剤
  - 3 反応プローブ担持タイル
  - 4 配列機
  - 5 吸引チャック
  - 6 反応チップ
- A, B, C 領域

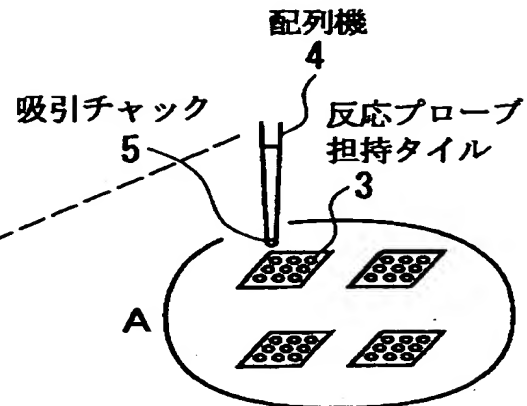
【書類名】 図面

【図 1】

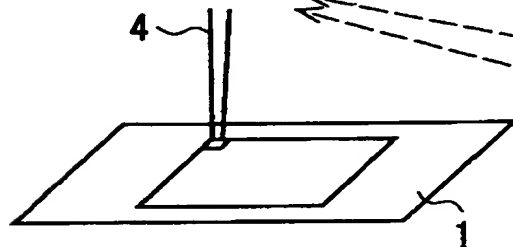
(a) 接着剤塗布



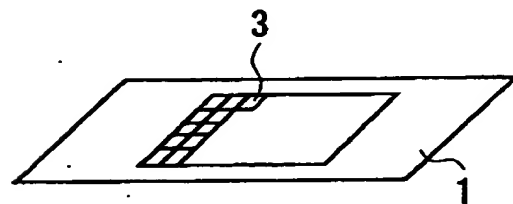
(b) タイル吸引・搬送



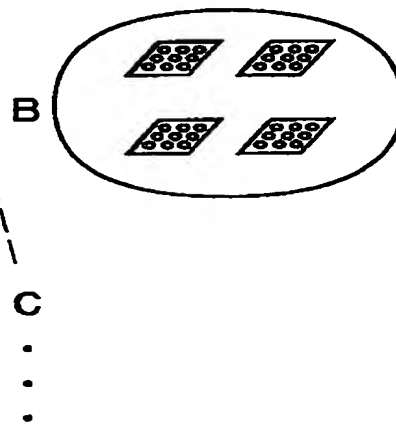
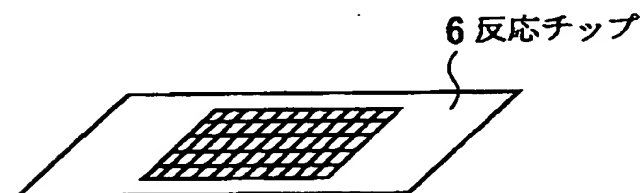
(c) タイル固定



(d) 配列



(d) 完成



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 フォトリソグラフィ技術を使用しない、より容易かつ安価に作製できるDNAチップ等の、反応性プローブをその表面に集積した反応プローブチップ及びその作製方法を提供する。

【解決手段】 反応性プローブを担持させたタイル状の担体を、基材の上の区分に整列固定させたことを特徴とする反応プローブチップ。タイル状の担体が反応性表面を持つ材料であり、基材が薄板状の無機基板か薄膜状の有機基板であることが好ましく、なかでもタイル状の担体がガラス又は多孔質ガラスであり、無機基板がスライドガラス又はシリコンウエハであり、有機基板がポリエステルフィルム又はポリエチレンフィルムであることが特に好ましい。

【選択図】 図 1

特2000-294463

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000239]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都大田区羽田旭町11番1号
氏 名	株式会社荏原製作所